

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020040009983 A  
(43)Date of publication of application: 31.01.2004

(21)Application number: 1020020044380  
(22)Date of filing: 23.07.2002  
(30)Priority: ..

(71)Applicant: AHRAM BIOSYSTEMS INC.  
(72)Inventor: JU, EUN MI  
KIM, JEONG HUI  
LEE, SI EUN

(51)Int. Cl. A61K 35/78

(54) EXTRACTS AND FRACTIONS OF BETULA PLATYPHYLLA VAR. JAPONICA HAVING ANTIOXIDANT AND/OR ANTICANCER ACTIVITIES

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are extracts and fractions of Betula platyphylla var. japonica having antioxidant and/or anticancer activities. They alleviate and/or treat cell damage by reactive oxygen species, remove radicals to inhibit the formation of lipid peroxide and have anticancer activity. CONSTITUTION: Betula platyphylla var. japonica is extracted with a polar solvent, such as 70% methanol. Therefore, the extract has antioxidation effects, such as inhibition of lipid peroxide formation and cell apoptosis, radical removal, activation of superoxide dismutase, catalase or glutathione peroxylase, and the like. A fraction of the Betula platyphylla var. japonica extract is fractioned with ethylacetate, butanol, hexane, dichloromethane or water.

copyright KIPO 2004

## Legal Status

Date of request for an examination (20020723)

Notification date of refusal decision ( )

Final disposal of an application (rejection)

Date of final disposal of an application (20050329)

Patent registration number ( )

Date of registration ( )

Number of opposition against the grant of a patent ( )

Date of opposition against the grant of a patent ( )

Number of trial against decision to refuse ( )

Date of requesting trial against decision to refuse ( )

Date of extinction of right ( )

**(19)대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

**(51) . Int. Cl.<sup>7</sup>**  
**A61K 35/78**

**(11) 공개번호** 10-2004-0009983  
**(43) 공개일자** 2004년01월31일

(21) 출원번호 10-2002-0044380  
 (22) 출원일자 2002년07월23일

(71) 출원인 아람 바이오시스템 주식회사  
 서울특별시 동대문구 장안3동 464-1 장안빌딩 405호

(72) 발명자 김정희  
 서울특별시 광진구 광장동 218-1 극동1차아파트 3동 706호

주은미  
 경기도광명시철산4동467-66

이시은  
 서울특별시도봉구창4동쌍용아파트112동401호

(74) 대리인 김동진

심사청구 : 있음

**(54) 항산화 및/또는 항암 활성을 가진 화피 추출물 및 분획물**

**요약**

본 발명은 천연약용식물의 추출물 및 분획물에 관한 것으로 특히, 항산화 및/또는 항암활성을 지닌 화피의 추출물 및 분획물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 추출물은 바람직하게는 70% 메탄올 화피 추출물이고, 분획물은 바람직하게는 에틸아세테이트, 부탄올, 물, hexan, 또는 디클로로메탄에 의해 추출된 분획물이다. 본 발명에 따른 추출물 또는 분획물은 활성 산소종에 의한 세포손상의 완화 및 치료의 목적으로 사용될 수 있고, 세포 손상의 주요 원인이 되는 라디칼(radical)을 소거하고 과산화지질의 형성을 억제하며, 세포 내의 항산화 효소의 활성을 증가시키므로 활성산소종을 제거하여 세포 손상을 막고, 또한 항암 활성을 가지고 있으므로 인체에 유익한 효과적인 약물로 개발 및 활용이 가능하다.

**대표도**

**도 1**

**색인어**

화피 추출물, 과산화지질 형성 억제, 활성산소종, 항산화 활성, 항암활성, 세포 핵 분절

**명세서**

**도면의 간단한 설명**

도1은, 화피 추출물이 과산화수소에 의하여 유도되는 세포 사멸을 방어하는 효과가 있음을 나타내는 그림으로 A는 과산화 수소에 의한 세포사멸 곡선이며, B는 화피 추출물이 과산화수소에 의하여 유도되는 세포 사멸을 방어하는 효

과를 나타내는 곡선이다.

도2는, 화피 추출물 및 분획이 DPPH 라디칼 소거 활성(radical scavenging activity)이 있음을 나타내는 그림이다. ● - 메탄올 추출물, ○ - 헥산 (Hexane), ▲ - 다이클로로메탄 (Dichloromethane), △ - 에칠아세테이트 (Ethyl acetate), ■ - 부탄올 (n-Butanol), □ - 수증 (Water)

도3은, 화피 추출물이 과산화수소에 의해 유도되는 세포의 핵 분절 현상을 방어하는 활성이 있음을 나타내는 그림으로 A는 정상대조군이며, B는 과산화수소에 의하여 유도되는 세포의 핵 분절 현상이며, C는 화피 추출물이 과산화수소에 의해 유도되는 세포의 핵 분절 현상을 방어작용이 있음을 나타낸다.

도4는, 화피 추출물 및 에칠아세테이트 분획이 과산화수소에 의해 유도되는 세포막 인지질의 과산화를 방어하는 활성이 있음을 나타내는 그림이다. ● - 메탄올 추출물, △ - 에칠아세테이트 (Ethyl acetate) 분획

도5는, 화피 추출물이 항산화 효소 작용을 나타내는 효소인, superoxide dismutase, catalase 및 Glutathione peroxidase의 활성을 증가시키는 작용이 있음을 나타내는 그림으로 A는 superoxide dismutase, B는 catalase C는 glutathione peroxidase의 활성이 증가됨을 나타낸다.

도6은, 화피 추출물이 상피세포암 세포주 (KB) (A)와 혈액암 세포주 (HL-60) (B)에 대하여 세포독성효과가 있음을 나타내는 그림이다.

도7은, 화피 추출물이 혈액암 세포주 (HL-60)에서 세포핵분절을 유도하는 효과가 있음을 보여주는 형광현미경 사진 그림으로 A는 정상 대조군을 B는 화피 추출물의 세포핵분절 유도 효과를 나타낸다.

도8은, 화피 추출물이 혈액암 세포주 (HL-60)에서 염색체 DNA 분절을 유도하는 효과가 있음을 보여주는 그림이다.

도9는, 화피 추출물이 혈액암 세포주 (HL-60)에서 세포사멸체 형성을 유도하는 효과가 있음을 flow cytometry로 분석한 결과를 보여주는 그림이다.

도10은, 화피 추출물이 혈액암 세포주 (HL-60)에서 세포사멸 (apoptosis)을 유도하는 단백질의 발현 및 활성 조절에 영향을 미치는 것을 나타내는 그림으로서, Bcl-2 는 변화가 없으며, Bax는 발현이 증가되고 caspase-3의 활성이 증가되며, PARP가 절단되는 현상이 나타남을 보여주는 그림이다.

표1은, 화피 추출물이 과산화수소에 의한 세포 사멸체 (subdiploid cells)의 생성을 저해하는 활성이 있음을 나타내는 표이다.

표2는, 화피 추출물이 혈액암 세포주 (HL-60)에서 세포 사멸체 (subdiploid cells)의 생성을 유도하며 따라서 세포의 세포주기분포의 변화를 초래하는 효과가 있음을 보여주는 표이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항산화 활성 및 항암 활성을 가진 추출물 및 분획물에 관하며, 특히 화피( *Betula platyphylla* var. japonica)로부터 추출되는 화피 추출물 및 분획물에 관한 것이다.

인체 등의 유산소 호흡을 하는 생명체들은 산소를 환원시켜 필요한 에너지를 생산한다. 이 과정에서 필수 불가결하게 생기는 부산물인  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$  등은 반응성이 매우 커서 적은 양으로도 생체내의 여러 물질과 반응하여 산화적 손상을 일으키며 이로 인해 세포의 기능이 저해되고 세포 사멸(apoptosis)을 초래하게 된다. 이들을 활성산소종 (reactive oxygen species)이라고 부르며 활성산소종에 의한 DNA, 단백질, 지질 및 작은 세포 분자들의 산화적 손상은 심장 질환(Witztum, 1993), 알츠하이머(Alzheimer)병과 같은 뇌신경계 장애(Richardson, 1993), 돌연변이나 암 등과 같은 많은 질병들과 노화 현상을 일으키는 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Finkel and Holbrook, 2000). 활성산소 중의 하나인 과산화수소는 세포 내에서 지질의 과산화와 DNA 손상을 야기하는 것으로 알려져 왔다(S. Ahmad, 1995). 또한 과산화수소(hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ )는 50  $\mu$  M 이상의 농도에서 다양한 동· 식물과 박테리아

세포에 독성을 나타낸다 (B. Halliwell et al., 2000).

활성산소종에 의한 산화적 손상은 라디칼(radical)의 생성 속도와 제거 속도간의 불균형에서 초래된다. 세포내에서는 자체적으로 라디칼을 제거할 수 있는 효소들이 있는데 이러한 항산화 작용을 하는 효소로는 수퍼옥사이드 (superoxide)를 분해하는 수퍼옥사이드 디스뮤타아제 (superoxide dismutase, SOD)나 과산화수소를 물과 산소로 전환시키는 카탈라아제 (catalase, CAT), 셀레늄을 활성 자리에 포함하고 있는 효소로서 과산화 수소뿐만 아니라 다른 과산화물들을 파괴하는 글루타치온 페록시다아제(glutathione peroxidase, GPX) 등이 있다 (Blake et al., 1987). 또한, 활성산소종과 반응할 수 있는 다른 분자내 물질로는 글루타치온 (glutathione, GSH), 플라보노이드(flavonoid), 유비퀴놀-10 (ubiquinol-10), 글루코오스 (glucose), 알부민 (albumin)등이 있다. 그 밖에 항산화 작용을 위해 외부에서 섭취할 수 있는 물질들로는 비타민 C, E, A 와 프로 비타민(pro-vitamin) A, 소량의 셀레늄(selenium)과 아연(zinc)등이 있다 (Halliwell and Gutteridge, 1998).

전 세계적으로 천연물로부터 항산화 활성을 가지는 성분을 분리하여 안전하고 강력한 항산화제를 만들려는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 콩이나 유지 종자, 허브, 차, 딸기류의 과실, 은행잎, 인삼 추출물, 과일이나 야채 등의 다양한 천연 항산화 물질에 대한 연구와 보고가 이어지고 있다. 포도 껍질에 다량 함유된 레즈베라트롤 (resveratrol)은 인체 혈액 암세포주 (human promyelocytic leukemia cell line)인 HL-60 세포 내에서 DNA 합성 능력을 저해하고 세포독성을 가짐으로써 항암작용을 나타내고 동시에 활성산소종에 의해 유도된 rat pheochromocytoma (PC12) 세포의 사멸을 감소시킴으로써 항산화 작용을 한다고 보고되었다 (M.V. Clement et al., 1998). 또한 녹차 잎에서 추출한 Epigallocatechin-3-galate는 D-galactosamine (GaIN)에 의해 유도된 rat의 간 손상을 억제하고 인체 전립선 암세포주 (human prostate cancer cell line)인 DU145 세포에서는 세포내 활성산소종의 형성을 증가시킴으로써 세포사멸을 유도한다 (L.Y. Chung et al., 2001). 홍삼종 (*Panax ginseng*)에서 분리된 ginsenoside 또한 HL-60 세포에서 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)에 의해 생성된 superoxide anion ( $O_2^-$ )을 소거하고 정상적인 마우스의 피부내에 TPA에 의해 유도된 tumor necrosis factor의 생성을 억제한다고 알려졌다 (S.J. Lee et al., 2000; Y.S. Keum et al., 2000). 여러 천연물들 중에 폐놀계 물질들은 잠정적인 항 종양 효과를 가지고 있다는 사실이 연구되어 왔다 (Y.J. Shur, 1998). 생강과 (*Curcuma longa* Linn)에 존재하는 curcumin은 diarylheptanoid를 가지는 물질로, 이것은 여러 실험 동물들과 배양된 세포 내에서 항암과 항돌연변이 효과를 가지는 것으로 알려졌다 (K.K. Soudamini et al., 1989; C.V. Rao et al., 1995). 암 등을 포함한 다양한 인간 질병과 병리적 발생기전의 관점에서 예행 세포사 (programmed cell death), 즉 세포사멸(apoptosis)는 많은 연구자들에게 중요한 문제로 생각되고 있다 (C.B. Thompson, 1995). 세포사멸은 세포의 분해를 위해 세포 내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음 기작으로, 형태적으로는 세포의 비중 감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축과 더불어 마지막 단계에 이르러서는 DNA 분절화와 세포 사멸체라는 포낭을 형성한다. 산화적 스트레스나 세포 내 칼슘 농도의 증가, 미토콘드리아의 막전위 변화, 그리고 세포막 수용체를 자극하는 다양한 자극원에 의해서도 세포사멸이 유발되고 실제로 많은 세포 독성 물질들이 *in vitro* 상에서 악성 종양 세포에 세포사멸을 유발한다고 보고되고 있다(S.M. Planchon et al., 1995; I. Muller et al., 1997).

항산화제는 광범위한 생화학적 활성을 가지는 물질로 활성산소종의 형성을 억제하고 세포 내 생성된 라디칼을 직접·간접적으로 소거하며 세포내의 산화·환원력을 변화시킨다(C.K. Sen, 1998). 몇몇 항산화제는 세포사멸의 억제제로서 사용되어 오기도 했다. 왜냐하면 세포는 산화적 스트레스에 의한 손상의 결과로 세포사멸이라는 과정을 거쳐 사멸하게 되기 때문이다(D.M. Hockenbery et al., 1993). N-acetylcysteine이나 dimercaptopropanol과 같이 황 (sulfur)을 포함한 항산화제들은 형질전환된 세포주에서 p53-종양 억제 유전자를 통해 세포사멸을 일으킨다고 알려졌다(M. Liu et al., 1998). 지금까지 항산화제로서 많은 종류의 천연 약재들이 연구되고 있다. 본 발명의 대상인 화피의 껍질은 폐렴, 신장염, 만성 기관지염 등을 치료하는 중국 전통 약재로 많이 사용되어 왔다. 그러나, 화피의 항산화 및 항암 활성에 관한 연구, 특히 분자적 수준에서의 연구는 현재까지 미비한 실정이다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은, 세포 손상의 주요 원인이 되는 라디칼과 과산화지질을 억제하고, 세포내의 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 활성 산소종을 제거하여 세포 손상을 막는 인체에 유익하고 효과적인 약물에 사용될 수 있는 추출물 또는 분획물을 제공하는 것이다.

또 다른 본 발명의 목적은, 암세포에서 세포 핵 분절 유도하고, 염색체 DNA 분절화를 유도하고, 세포 사멸체를 유도함으로써 항암 활성을 가진 추출물을 제공하는 것이다. 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 명세서에 첨부된 도면, 발명의 상세한 설명, 및 특허청구범위에 기재된 내용으로부터 본 발명의 다른 목적 및 장점을 쉽게 인식할 수 있다.

#### 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 추출물은 항산화 및 항암 활성을 나타내며, 극성용매로 추출된 화피 추출물이다.

또한 본 발명의 분획물은, 항산화 활성을 나타내는 화피 분획물이다. 본 발명의 화피 추출물은 바람직하게는 70% 메탄올 추출물이고, 화피 분획물은 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 또는 물에 의해 추출된 분획물이다. 또한 더 바람직하게는, 본 발명에 따른 추출물 또는 분획물은 과산화지질 억제 활성, 라디칼 소거 활성, 과산화수소에 의한 세포 사멸체의 형성을 저해하는 활성, 과산화수소에 의한 세포의  $G_2/M$  세포주기 정지 현상을 일어나지 않게 하는 활성, 수퍼옥사이드 디스무타아제(SOD), 카탈라아제(CAT), 또는 글루타치온 페록시다아제(GPX)의 활성을 촉진하는 것을 나타내는 것을 특징으로 한다. 또한 바람직하게는 본 발명에 따른 화피 추출물은, 활성산소종에 의해 유도되는 세포의 핵 분절 현상 저해 활성, 세포의 사멸체 형성을 저해하는 활성, 활성산소종에 의해 처리된 세포에서 항산화 활성, 활성산소종으로 처리된 암 세포에서 항암 활성, 암세포에서 세포 핵 분절을 유도 및 염색체 DNA 분절을 유도하는 활성, 상기 추출물은 암세포에서 Bax의 발현을 증가시키는 활성, 또는 상기 추출물은 암세포에서 caspase-3의 활성을 촉진시키는 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 실시에는 본 발명을 설명하기 위한 것이지, 발명의 범위를 한정하기 위한 것이 아니다.

## 1. 추출물 제조 방법

1) 화피의 메탄올 추출물 및 분획의 제조 화피는 경동시장에서 구입하였으며 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 구입한 화피를 잘게 분쇄한 후 둥근 플라스크에 약 100 g과 70% 메탄올을 넣고, 80℃로 가열하여 환류하면서 3시간 이상 추출하였다. 이를 상온으로 온도를 낮추고 거름종이를 이용하여 추출액을 걸러 남은 시료를 다시 위와 같은 방법으로 1회 반복하여 추출하고 거름액을 합쳐서 감압 농축하였다. 이를 증류수에 녹여 동결 건조시켜 분말로 만든 후 -70℃에 보관하였다. 분획은 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올을 단계적으로 가하여 추출한 후 감압 농축기 (Eyela, Japan)로 용매를 증발시키고 디메틸 술폰산 (dimethyl sulfoxide, DMSO)에 100  $\mu$ g/ml가 되도록 녹여 -70℃에 보관하였다. 본 연구에서는 이들을 세포배양배지 또는 생리 식염수 (phosphate-buffered saline)에 여러 가지 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2) 세포배양

본 연구에 사용된 세포주는 V79-4 (chinese hamster lung cell line ; ATCC CCL-93), KB (human oral epidermoid carcinoma cell line ; ATCC CCL-17), HL-60 (human promyelocytic leukemia cell line)로서, V79-4 세포는 DMEM (GibcoBRL, USA) 배지에 5% fetal bovine serum (FBS; Bio-whittaker, USA), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (GibcoBRL, USA), 100 unit/ml penicillin (GibcoBRL, USA)과 2 mM L-glutamine (Bio-whittaker, USA)을 넣고 37℃에서 5%  $CO_2$  / 95% air 의 조건하에 배양하였다. KB와 HL-60 세포주도 위와 같은 조건하에서 배양하였고 단, KB 세포는 10% FBS와 혼합된 DMEM에서 그리고 HL-60 세포는 10% FBS를 혼합한 RPMI-1640 (GibcoBRL, USA) 배지에서 배양하였다.

## 2. 실험 방법

### 실험1. 세포의 생존율 실험

세포의 생존율 실험은 MTT assay를 이용하였다. V79-4 세포를 96-well microplate에 넣고 0, 4, 20 및 100  $\mu$ g/ml의 화피 추출물로 처리하였다. 1시간 배양후, 100  $\mu$  M 과산화수소를 배지에 넣어주고 다시 24시간 동안 배양하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma, USA)는 생리식염수에 5 mg/ml로 녹여 0.2  $\mu$ m filter로 거른 뒤 -20℃에 분주하여 보관하였고 필요시 녹여 사용하였다. MTT 20  $\mu$ l를 가하고 4시간 동안 배양 후 각 well의 배양액을 제거하고 형성된 formazan salt에 0.04 N HCl이 함유된 isopropanol 100  $\mu$ l를 넣어 가볍게 진탕하여 완전히 용해시킨 후, ELISA reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm 파장 (reference 655 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 화피 추출물의 세포 독성 측정실험에서도 MTT assay를 이용하였다. KB와 HL-60 세포를 96-well microplate에서 배양한 후 0, 20, 100 및 500  $\mu$ g/ml의 화피 추출물을 처리하였다. KB의 경우 48시간 및 72시간 동안 배양하여 세포 독성을 측정하였고 HL-60 세포의 경우에는 48시간을 배양하여 독성을 확인하였다. 파장은 570 nm (reference 655 nm)로 하여 흡광도를 측정하였다.

### 실험2. DPPH 라디칼 소거 측정 실험

$1.5 \times 10^{-4}$  M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma) 600  $\mu$ l에 화피 추출물의 농도가 0.8, 4, 20 및 100  $\mu$ g/ml가 되도록 각각 가한 후 methanol 용액을 가하여 최종 부피를 3 ml로 만들었다. 이를 10초간 진탕하여 잘 섞은 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 DPPH 라디칼의 소거 활성을 산정 하였다.

Radical scavenging activity (%) = {(ODcontrol-ODsample)/ODcontrol} × 100

각 시료의 항산화 작용은 IC<sub>50</sub> (DPPH 라디칼 형성을 50%로 억제하는데 필요한 시료의 농도) 값으로 나타내었다.

### 실험 3. 과산화지질 억제 활성 측정 실험

세포막의 구성 성분인 인지질의 불포화 지방산은 라디칼에 의해 과산화반응을 일으키며 이 때 생성된 과산화지질은 세포막 손상의 주요 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 지질 과산화반응의 억제는 항산화 활성 검정에 중요한 지표로 이용되고 있다. 본 연구에서는 산화적 손상을 일으키는 원인 물질로서 활성 산소종인 hydroxyl radical을 생성하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가한 후의 세포 배양시간을 변화시키면서 과산화지질 형성량을 조사한 결과 최적의 조건은 1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 1시간의 배양시간이었다. 과산화지질 억제 활성을 측정하기 위하여 배양한 V79-4 세포에 각 생약 추출물의 농도가 100, 20 및 4 µg/ml가 되도록 가한 후 1시간 동안 배양하였다. 다음 산화적 스트레스를 일으키기 위하여 과산화수소의 농도가 1 mM 되도록 가한 후 다시 1시간 동안 배양하였다. 처리한 세포를 생리 식염수로 잘 씻은 후 1.15% KCl 500 µl를 가하여 세포를 수확하고 microfuge tube로 옮긴 다음 4℃를 유지하면서 균질화(homogenization)하여 사용하였다. 이 마쇄 균질액 100 µl에 Ohkawa 등의 방법(Ohkawa *et al.*, 1979)에 준해 8.1% SDS 200 µl, pH를 3.5로 조절한 20% acetic acid 1.5 ml 및 0.8% TBA 1.5 ml를 각각 가하고 증류수로 최종 부피가 4 ml 되도록 채웠다. 이 용액을 잘 섞은 후 95℃에서 2시간 동안 가열하여 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 착색 물질을 n-butanol : pyridine (15:1, v/v) 혼합액으로 추출하여 1800 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 취해 532 nm에서 흡광도를 측정하고 과산화지질 억제 활성을 구하였다.

### 실험 4. 슈퍼옥사이드 다스뮤타아제(Superoxide dismutase;SOD) 활성 측정 실험

SOD 활성은 Beauchamp와 Fridovich (1971)의 NBT (nitroblue tetrazolium) 방법으로 측정하였다. 추출물을 처리한 세포에 0.05 M 탄산 나트륨 완충용액 (pH 10.2)을 가하여 균질화하여 사용하였다. 이 마쇄 균질액 50 µl에 3 mM xanthine, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 1.5 mg/ml BSA (bovine serum albumin)을 가하여 진탕한 후 0.1 mg/ml의 xanthine oxidase 50 µl를 가하고 상온에서 30분 동안 방치하였다. 반응은 6 mM CuCl<sub>2</sub>를 가하여 멈춘 후 1500 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 취해 560 nm에서 흡광도를 측정하고 SOD 활성을 구하였다.

### 실험 5. 카탈라아제 (Catalase; CAT) 활성 측정 실험

시료를 처리한 마쇄 균질액 100 µl에 3% 과산화수소 12 µl를 가하고 50 mM 인산완충용액 (pH 7.0)으로 최종 부피가 1 ml 되도록 채웠다. 이 용액을 37 ℃에서 2분 동안 방치한 후 240 nm에서 5분 동안 과산화수소의 흡광도 변화를 측정하였다 (Carrillo *et al.*, 1991).

### 실험 6. 글루타치온 페록시다아제(Glutathione peroxidase: GPX)활성 측정 실험

Paglia와 Valentine (1967)의 방법에 따라 시료를 처리한 마쇄 균질액 100 µl에 1 mM EDTA, 10 mM GSH, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 unit의 glutathione reductase, 1.5 mM NADPH를 가한 후 37 ℃에서 10분 동안 방치하였다. 이 용액에 과산화수소를 1 mM 되도록 각각 가한 후 340 nm에서 NADPH의 흡광도 변화를 측정하였다.

### 실험7: 핵 분절 현상 방어 또는 유도 확인 실험

V79-4 세포를 멸균된 커버 글래스에 배양하고 100 µg/ml의 화피 추출물을 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 세포가 부착 된 커버 글래스를 조심스럽게 꺼내 생리 식염수로 씻은 후, 공기 중에서 건조시켰다. 위와 같이 처리 된 V79-4 세포를 100% 에탄올에 최소한 5시간 이상 담가두어 세포를 완전히 고정시켰다. HL-60 세포는 60 mm dish에서 화피 추출물이 500 µg/ml가 되도록 가하고 24시간이 지나 세포를 수확하였다. 5×10<sup>5</sup> cells/ml의 세포농도가 되도록 생리 식염수를 가해 세포 현탁액을 만들고 이들 중 50 µl를 취해 500-1000 rpm에서 10분간 cell spin (Hanil, Korea)을 이용하여 세포를 슬라이드에 부착시켰다. 세포가 부착 된 슬라이드를 공기 중에서 건조시켰다. 위와 같이 처리 된 HL-60 세포를 100% 에탄올에 최소한 5시간 이상 담가두어 세포를 완전히 고정시켰다. 고정된 세포는 생리 식염수로 세척하고 DNA 특이 형광염료인 propidium iodide (PI)로 10분간 염색하였다. 염색된 세포는 형광현미경 (Nikon eclipse E800, Japan)을 통해 관찰하였다.

### 실험8. 염색체 DNA 분절 현상 유도 확인 실험

1×10<sup>6</sup> cells/ml 농도의 HL-60 세포에 0, 4, 20, 100 및 500 µg/ml의 화피 추출물을 가해 24시간 동안 배양하였다. 또 다른 조건에서는 500 µg/ml의 화피 추출물을 가해 0, 3, 7, 16, 24 및 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각각의

세포를 수확하여 750 × g에서 5분간 원심분리하고 침전물을 ice-cold 생리 식염수로 세척하였다. 위와 같은 조건으로 다시 한번 원심분리 한 후, 세포 침전물에 1×TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 가해 1×10<sup>6</sup> cells/ml 농도가 되도록 하였다. 그런 후, 5배의 lysis buffer (0.5% SDS, 25 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7.5)를 가해 세포 침전물을 용해시켰다. 시료에 Proteinase K의 최종농도가 1 mg/ml 가 되도록 가하고 시료를 50 °C에서 3시간 또는 O.N. 동안 방치하였다. 시료에 phenol:chloroform (1:1) 추출을 2-3번 반복하여 시료 중의 단백질을 제거하고 다시 chloroform을 가해 시료 내에 남아있는 phenol을 완전히 제거하였다. 시료 용량의 1/10 배의 3 M sodium acetate와 2와 1/2 배의 ice-cold ethanol을 넣어 -20 °C에서 O.N. 동안 방치하거나 -70°C에서 1 시간 동안 방치하여 DNA를 침전시켰다. 15000 × g에서 20분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 70% ethanol을 가해 침전물을 세척하고 진공 하에서 (speed vacuum; Savant, Holbrook, NY) DNA를 건조시킨 후, 건조된 DNA를 100 μl의 1×TE로 용해시켰다. DNase-free RNase를 최종 농도 200 μg/ml가 되도록 가하고 37 °C에서 1시간 동안 그리고 65 °C에서 5분간 방치하였다. 분리된 DNA를 1.5% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide (0.5 μg/ml) 염색을 한 후, 자외선 조사(UV irradiation)을 통해 가시화 하였다.

#### 실험9: Flow cytometry 분석

V79-4 세포에 100 μ M 과산화수소를 처리하고 7시간 및 24시간동안 배양하였다. 또한 100 μg/ml의 화피 추출물을 미리 처리한 후, 과산화수소를 가해 위와 같이 7시간과 24시간 동안 배양하였다. HL-60 세포는, 1×10<sup>6</sup> cells/ml 농도의 HL-60 세포에 500 μg/ml 화피 추출물을 처리하고 0, 3, 7, 16, 24 및 48시간 동안 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 V79-4 세포와 HL-60 세포를 750 × g 에서 각각 5분간 원심분리 하였다. 생리 식염수로 세포 침전물을 세척한 다음, 위와 같은 조건으로 다시 원심분리 하였다. 생리 식염수와 McIlvaine's buffer (0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M citric acid, pH 7.5)의 1:1 혼합용액 1 ml를 가한 후, 2배의 cold-ethanol을 가했다. 4 °C에서 1시간동안 보관한 후, 750 × g에서 10분동안 원심분리 하였다. 생리 식염수로 2번 세척하고 2 ml PI staining solution (10 μg/ml propidium iodide, 100 μg/ml DNase-free RNase in PBS)을 넣고 37 °C 암실에서 2시간 배양하였다. Flow cytometer (FACS-caliber, Becton Dickinson)로 시료를 분석하였다.

#### 실험10. Western blot 분석

HL-60 세포에 각각 다른 농도와 시간대로 화피 추출물을 처리하였다. 세포를 수확하고 750 × g에서 5분간 원심분리 하였다. 세포침전물을 생리 식염수로 세척한 후, 다시 한번 원심분리하고 100 μl의 ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 100 mM NaF, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 10 mM Na pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.5)를 가해 30분 동안 세포를 용해시켰다. 용해된 시료는 15000 × g에서 15분 동안 원심분리 하였고 Lowry 분석법 (Bio-rad, USA)을 통해 단백질의 농도를 측정하였다. 단백질 30-50 μg 을 7-15% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 전기영동 후, SDS-polyacrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Germany)에 2시간 동안 transfer (30 mA, Pharmacia biotech)하고 transfer 된 membrane은 TBST buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.8)에 5%로 만들어진 skim milk를 가해 최소 2시간동안 배양하였다. 그런 후 TBST buffer로 10분 동안 세 번 세척하였다. Nitrocellulose membrane에 1차 항체 (anti-Bcl-2; Oncogene, Mouse monoclonal antibody, 1:1000 in TBST buffer, anti-Bax; Santa Cruz Biotechnology, rabbit polyclonal antibody, 1:500 in TBST buffer, anti-caspase; Transduction, Laboratories, mouse monoclonal antibody, 1:500 in TBST buffer, and anti-PARP; Santa Cruz Biotechnology, rabbit polyclonal antibody, 1:2000 in TBST buffer)를 가해 실온에서 1시간 동안 방치하고 TBST 완충용액으로 10분 동안 세 번 세척하였다. 1:1000으로 희석한 horseradish-conjugated 2차 항체를 가해 40분 정도 배양한 후 위와 같이 TBST로 세척하였다. Membrane에 옮겨진 단백질들은 enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)를 이용해 단백질 발현 정도를 확인하였다.

### 3. 실험결과

#### 1] 화피 추출물의 항산화 효과

화피 추출물 및 분획의 항산화 활성은 세포의 생존율(실험1), DPPH 라디칼 소거활성(실험2), 과산화지질 억제 활성(실험3) 등에 의해 측정되었다.

#### 1) 화피 추출물의 과산화수소에 의한 세포독성 방어 효과

세포의 생존율 측정 실험(실험1)의 결과는 도1A, 도1B에 도시하였다. 화피 추출물이 과산화수소에 의하여 유도되는 세포 사멸을 방어하는 효과가 있음을, 도1A, 도1B를 통해서 알 수 있다. 도 1A는, 과산화 수소에 의한 세포 사멸 곡선이며, 도1B는 화피 추출물이 과산화수소에 의하여 유도되는 세포사멸을 방어하는 효과를 나타내는 곡선이다. 도1A를 참조하면, 정상세포 V79-4에 과산화수소만을 처리하였더니 세포의 생존율이 확연하게 감소한 것을 알 수 있다. 세포

에 각각 1, 12.5, 25, 50, 100 및 1000  $\mu$  M의 과산화수소를 처리한 결과, 과산화수소의 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 감소하였고 이때, 세포의 생존율을 50% 감소시키는 과산화수소의 농도 IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration)은 약 100  $\mu$  M 이었다. 도1B를 참조하면, 4, 20 및 100  $\mu$ g/ml의 화피 추출물을 세포에 가한 후 과산화수소 100  $\mu$  M을 처리한 경우에는 과산화수소에 의한 세포사멸이 저해됨을 알 수 있다. 화피 추출물의 농도에 따라 각각 18, 27 그리고 84% 의 방어율을 나타내며, 100  $\mu$  M의 과산화수소에 대해 세포의 치사율을 50% 방어하는 화피 추출물의 농도 ED<sub>50</sub> (50% effective dose)은 37.7  $\mu$ g/ml 이다.

## 2) 화피 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성

화피 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성 실험(실험2) 결과는 도2에 도시하였다. 도2를 참조하면, 모든 시료에 있어서 가해진 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거 활성도 증가하는 농도 의존성이 나타났으며, 화피의 메탄올 추출물은 IC<sub>50</sub> 2.4  $\mu$  g/ml의 높은 소거 활성을 나타내었다. 분획 시료에서는 에틸아세테이트와 부탄올, 물 분획의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 5.9, 8.1, 11  $\mu$  g/ml로서 가장 높은 소거 활성을 보였다. 헥산과 디클로로메탄 분획의 IC<sub>50</sub> 값은 모두 > 20  $\mu$  g/ml로서 유의할만한 결과를 나타내지 못하였다.

## 3) 화피의 메탄올 추출물과 분획시료의 과산화지질 억제 활성

화피의 메탄올 추출물과 분획 시료의 과산화지질 억제 활성 측정 실험(실험3)의 결과는 도4에 도시하였다. 도4를 참조하면, 메탄올 추출물로 처리한 세포의 과산화지질 억제 활성은 IC<sub>50</sub> <4.0  $\mu$  g/ml로 매우 높은 값을 보였다. 에틸아세테이트 분획의 경우엔 IC<sub>50</sub> 6.5  $\mu$  g/ml로서 메탄올 추출물보다는 다소 낮은 과산화지질 억제 활성을 나타내었다.

## 4) SOD 활성

화피의 항산화 작용에 의한 세포내 항산화 효소 활성의 변화를 알아보기 위하여 화피의 메탄올 추출물로 처리한 V79-4 세포 내의 SOD, CAT, 및 GPX 활성을 측정하였다. SOD 활성 측정 실험(실험4)의 결과는 도 5A에 도시하였다. SOD 활성은 메탄올 추출물의 농도를 4, 20, 100  $\mu$  g/ml로 증가시키기에 따라 21, 31, 36 %로 증가함으로써 농도의존성을 보였다. 약제를 처리하지 않은 대조 세포에서의 SOD 활성은 24.9  $\pm$  1.5 U/mg 단백질이었다.

## 5) CAT 활성

CAT 활성 측정 실험(실험5)의 결과는 도5B에 도시하였다. CAT 활성은 SOD 활성보다 다소 낮은 증가를 나타내었다. 메탄올 추출물을 4, 20, 100  $\mu$  g/ml의 농도로 가했을 때 각각 12, 20, 24%로 CAT 활성이 증가되었다(도5B). 모든 시료는 4에서 100  $\mu$  g/ml의 농도 범위에서 농도 의존적인 CAT 활성 증가를 보였으며, 대조 세포의 CAT 활성은 14.9  $\pm$  1.9 U/mg단백질이었다.

## 6) GPX 활성

GPX 활성 측정 실험(실험6)의 결과는 도 5C에 도시하였다. GPX의 활성은 앞의 두 경우에 비해 매우 높은 증가를 나타내었다. 4, 20, 및 100  $\mu$  g/ml의 화피 추출물로 처리했을 때 GPX 활성은 각각 51, 62, 및 67%의 증가를 나타내었다(도5C). 다른 항산화 효소 활성과 마찬가지로 GPX 활성도 시료의 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 농도의존성이 관찰되었다. 시료를 처리하지 않은 대조 세포의 GPX 활성은 11.7  $\pm$  1.3 U/mg 단백질이었다.

## 7) 과산화수소에 의해 유도되는 세포의 핵 분절 저해 효과

핵 분절 현상 방어 효과 확인 실험(실험7)의 결과를 도 3A, 3B에 도시한다. DNA 특이 형광염료인 propidium iodide (PI)를 이용하여 세포 내 핵의 형태적 변화를 관찰하였다(배율  $\times$ 200). 대조군에서는 핵의 형태에서 어떠한 변화도 관찰되지 않고 정상적인 세포의 상태를 나타내었다 (도 3A). 세포에 100  $\mu$  M 과산화수소를 처리한 후 관찰한 결과, 세포 내 핵의 크기가 대조군보다 작은 크기로 관찰되어 형태적 변화인 핵분절현상이 일어났음을 알 수 있었다 (도 3B). 그러나 100  $\mu$ g/ml의 화피 추출물을 미리 처리한 후 과산화수소를 가하였더니 과산화수소만을 처리하였을 때와는 달리 핵에 큰 변화가 생기지 않았고 대조군과 비교하여 별 차이를 나타내지 않았다 (도 3C). 따라서 화피 추출물이 과산화수소 처리에 의해 생성되는 핵 분절현상 (nuclear fragmentation)을 방어함을 알 수 있었다.

## 7) 과산화 수소에 의한 세포 사멸체의 형성 저해 활성

화피 추출물이 세포사멸체 형성 및 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 flow cytometry 분석을 실시(실험9)한 결과, 산화적 스트레스에 의해 유도된 G2/Marrest를 화피 추출물이 회복시켜 준다는 사실을 알 수 있었다.



V79-4 세포에 100  $\mu$  M 과산화수소만을 처리하고 각각 7시간과 24시간 동안 배양한 대조군과 100  $\mu$ g/ml 화피 추출물을 미리 처리한 후, 과산화수소 스트레스를 가해 7시간과 24시간 동안 배양한 실험군을 비교하였더니 다음과 같은 결과가 관찰되었다. 7시간 동안 과산화수소만 처리한 세포의 경우, G2/M phase에 있는 세포가 42.7% 이었으나 화피 추출물을 전 처리하였더니 세포의 양이 35.6%로 감소하였다. 또한 24시간의 경우에도 과산화수소만 처리한 세포는 G2/M phase에 있는 세포의 양이 33.4% 이었으나 화피 추출물을 미리 처리한 경우는 25.9%로 세포의 양이 감소됨을 관찰하였다 (표1).

표1. 화피 추출물이 과산화 수소에 의한 세포 사멸체의 생성을 저해하는 활성이 있음을 나타내는 표

화피 추출물 디처리한 세포					화피 추출물 처리한 세포			
시간	Subdiploid cell(%)	G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)	Subdiploid cell(%)	G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)
0	0	53.8	23.3	22.9	0	53.8	23.3	22.9
7	6.1	30.0	28.6	41.4	0	35.9	29.2	34.9
24	4.2	44.6	23.5	31.9	0.8	53.7	24.2	23.1

## 2] 화피 추출물의 항암 효과

### 1) 암세포주에 대한 화피 추출물의 세포 독성 효과

화피 추출물이 상피암 세포인 KB와 혈액암 세포 HL-60의 생존율에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 화피 추출물의 농도 변화에 따른 세포의 생존율을 측정하였다. (실험1). 실험1 결과는 도6 A,B에 도시한다. 도6 A,B를 참조하면, 0, 4, 20, 100 및 500  $\mu$ g/ml의 화피 추출물을 각각 KB와 HL-60 세포에 처리한 결과 세포의 생존율이 농도 의존적으로 감소한다는 것을 알 수 있다. 세포의 생존율을 50% 감소시키는 농도인 화피 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 KB 세포의 경우 304.0  $\mu$ g/ml (도6 A) 이었고 HL-60 세포에 대해서는 159.0  $\mu$ g/ml 이었다 (도 (가)B). 위의 결과를 통해 HL-60 세포가 화피 추출물에 더욱 민감하다는 사실을 알 수 있었다.

### 2) HL-60 세포에서 화피 추출물의 세포 핵 분절 유도 효과

HL-60 세포에서 화피 추출물의 세포 핵 분절 유도 효과 확인 실험의 결과는 도7A, B에 도시한다. 본 실험에서는, DN A 특이 형광염료인 propidium iodide (PI)를 이용하여 세포 내 핵 분절 현상을 관찰하였다 (배율  $\times$ 200)(실험7). 대조군으로서 0.1% DMSO를 처리한 HL-60 세포는 핵의 형태에 있어 정상적인 형태소견을 나타내었다 (도 7 A). 이와 대조적으로 HL-60 세포를 500  $\mu$ g/ml 화피 추출물이 들어있는 배지에서 24시간 동안 배양한 결과, 핵 분절 현상이 관찰되었다 (도 7B).

### 3) HL-60 세포에서 화피 추출물의 염색체 DNA 분절화 유도 효과

세포 사멸을 유도하는 여러 가지 메커니즘 중 한가지는 세포사멸 (apoptosis)을 통해 세포사멸을 증가시키는 것이다. 그러므로 세포사멸 현상의 생화학적 특징 중에 하나인 아가로스 젤 전기영동 시, 사다리형 DNA 분절을 확인함으로써 화피 추출물의 세포 사멸 유도기전을 알아보았다(실험8). 실험8의 결과는 도8 A, B에 도시한다. 본 실험에서는, 농도에 따라 0, 4, 20, 100 및 500  $\mu$ g/ml의 화피 추출물을 24시간 동안 배양하거나 또는 500  $\mu$ g/ml의 화피 추출물을 0, 3, 7, 16, 24 및 48시간 동안 배양하였다. DNA 추출 후, 1.5% 아가로스 젤에 전기영동하여 ethidium bromide 염색을 통해 관찰한 결과, 시간과 농도에 따라 DNA 분절 현상이 나타났다. 도8A에서 알 수 있듯이, 각각 다른 농도의 화피 추출물을 24시간동안 처리하니 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 DNA 분절현상이 관찰되기 시작하였고 농도 의존적인 양상으로 500  $\mu$ g/ml의 화피 추출물이 처리된 상태에서도 분절현상이 관찰되었다. 도8B에서는 500  $\mu$ g/ml 화피 추출물을 3 시간정도 처리하였더니 DNA 분절현상이 나타나기 시작하였고 화피 추출물을 48시간동안 처리한 결과에서도 분절화가 관찰되었다.

### 4) HL-60 세포에서 세포 사멸체의 형성 유도

화피 추출물이 HL-60 세포 내에서 세포사멸을 야기하는지 알아보기 위해 flow cytometry 분석을 실시(실험9)하였다. 본 실험의 결과는 도9A, B에 도시한다. 표2 에서 알 수 있듯이, 시간과 농도 의존적인 양상으로 subdiploid 세포의 수가 증가함이 관찰되었다. HL-60 세포에 500  $\mu$ g/ml의 화피 추출물을 각각 3, 7, 16, 24 및 48시간 동안 처리한 결과, 25.5, 46.3, 58.2, 72.9, 및 87.7%로 시간 의존적인 양상을 나타내면서 subdiploid 세포의 수가 증가하였다 (도9A). 또한 4, 20, 100 및 500  $\mu$ g/ml의 화피 추출물을 24시간 동안 처리하였더니, 도9A와 마찬가지로 subdiploid 세포의

수가 증가하였고 그 수치는 0, 5.7, 12.2, 및 64%의 증가를 나타내었다(도9B). 표2는, 화피 추출물이 혈액암 세포주 (HL-60)에서 세포 사멸체 (subdiploid cells)의 생성을 유도하며 따라서 세포의 세포주기분포의 변화를 초래하는 효과가 있음을 보여준다.

표2. 화피 추출물이 혈액암 세포주에서 세포 사멸체의 생성을 유도하며 따라서 세포의 세포주기분포의 변화를 초래하는 효과를 보여 주는 표

Dose ( $\mu$ g/ml)	Subdiploid cells (%)	G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)
0	0	55.7	24.6	19.7
4	0	53.3	26.8	19.9
20	5.7	57.6	21.2	15.5
100	12.2	53.2	19.1	15.5
500	64.0	21.0	10.3	4.8

시간 (hr)	Subdiploid cells (%)	G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)
0	0	51.1	26.4	22.5
3	25.5	38.1	21.0	15.4
7	46.3	28.0	14.4	11.3
24	72.9	15.7	6.1	5.3
48	87.7	7.1	3.8	1.3

#### 5) 분자적 수준에서 HL-60 세포에서 세포사멸체의 형성 유도

화피 추출물에 의해 유도된 apoptosis의 분자적 메커니즘을 이해하기 위해 apoptosis 관련 단백질들의 발현변화를 분석하였다(실험10). 실험13의 결과는 도(마)에 도시한다. 본 실험에서는 먼저 HL-60 세포 내에서 세포 사멸이 caspase-3의 활성화와 관계가 있는지를 확인하였고 계속해서 Bcl-2, Bax, 및 Poly(ADP-riboseyl)polymerase (PARP) 단백질의 발현정도를 알아보았다. 우선 미토콘드리아 내에 있는 anti-apoptotic Bcl-2 단백질과 pro-apoptotic Bax의 발현을 통해 세포사멸이 일어나는지를 관찰하였더니, Bcl-2는 시간이 지남에 따라 단백질의 양에 변화가 없었지만 Bax는 시간에 따라 단백질의 양이 증가하였다. 따라서 Bcl-2와 Bax의 비율이 상대적으로 감소함을 알 수 있었다. Caspase-3는 시간에 따라 활성화되어 32 kDa의 전구체가 절단됨을 관찰하였다. caspase-3의 기질인 PARP도 시간이 지남에 따라 절단됨으로서 전구체인 116 kDa이 감소하고 85 kDa의 단백질이 증가하였다 (도 (마)).

#### 3. 실험 결과의 고찰

본 실험에서 산화적 스트레스에 대한 화피 추출물의 방어효과는 세포의 생존율과 DPPH 라디칼 소거 그리고 형광염색법을 통한 세포 사멸체의 증감정도를 확인함으로써 검증하였다. 정상세포인 V79-4에 과산화수소만을 처리한 결과 세포의 생존율이 농도 의존적으로 감소하였고 100  $\mu$  M 과산화수소 존재 시에는 50% 정도의 세포가 사멸하였다. 그러나 화피 추출물을 미리 처리하고 스트레스를 준 결과, 세포의 생존율이 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한 2.4  $\mu$ g/ml의 낮은 농도로 화피 추출물이 DPPH 라디칼을 50% 감소시켰다. 또한 5 가지의 극성이 서로 다른 유기용매를 이용하여 제조한 분획시료로 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 화피 추출물 및 에틸아세테이트 분획은 우수한 세포막의 인지질 과산화물 형성을 억제하는 활성을 나타내었다. 또한, 화피 추출물은 세포내의 항산화 효소인 SOD, CAT, 및 GPX의 활성을 증가 시켰다. 이러한 결과로서, 화피 추출물의 항산화 효과의 작용기작을 항산화 효소의 활성 증가에 의한 것임을 시사한다. 형광 염색을 통한 현미경적 관찰을 통해 100  $\mu$  M 과산화수소가 처리된 배지에서 자란 세포는 세포사멸의 산물인 세포 사멸체를 형성하는 것이 관찰되었으나 화피 추출물을 처리한 세포에서는 세포 사멸체가 거의 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 미루어 화피 추출물이 과산화수소에 의해 야기된 세포 손상에 대해 중요한 방어 효과를 가짐을 알 수 있었다. 또한 Flow cytometry 결과를 통해 흥미로운 사실을 발견하였다. 과산화수소만 처리한 세포와 화피 추출물을 함께 처리한 세포를 비교해 볼 때, 과산화수소만 처리한 V79-4 세포 내에서 야기된 G2/M arrest가 화피 추출물의 처리로 인해 감소함을 관찰하였다.

또한, 우리는 다양한 방법을 통해 화피 추출물이 HL-60 세포에서 사멸을 야기함을 증명하였다. KB와 HL-60 세포에 화피 추출물을 처리함으로써, 이 물질이 암세포의 성장을 억제한다는 사실이 설명되었다. 아가로스 겔 전기영동을 통해 핵 내 DNA가 분절됨으로써 화피 추출물을 처리한 HL-60 세포 내에서 세포사멸이 활발하게 진행됨을 알 수 있었고 flow cytometry를 통한 결과는 세포 사멸체가 시간에 따라 증가함을 보여줌으로서 화피 추출물이 암세포 내에서

apoptosis를 유발한다는 사실을 더욱 확고히 하였다.

현재 알려진 세포사멸에는 크게 2부류의 유전자가 관여하고 있는데, 하나는 세포 죽음을 억제하거나 증가시키는 조절 역할을 하는 Bcl-2 family 유전자군이고 다른 한 부류는 caspase 유전자군으로서, 실제로 세포 죽음을 실행하는 killer gene이다( T. Okura et al., 1998). Bcl-2 family는 B-cell lymphoma에서 발견된 유전자로서 12개 이상의 단백질로 구성되어 있다. 이들은 크게 세 개의 작용기 (functional group)으로 나뉘는데 그 중에서도 anti-apoptotic 활성을 가지는 Bcl-2 (26 kDa)와 pro-apoptotic 활성을 가지는 Bax (21 kDa)가 있고 이들은 서로 homo- 또는 heterodimer를 형성하면서 작용한다. 그러나 그들의 정확한 작용기전에 대해서는 아직까지 알려져 있지 않다( M.L. Kuo et al., 1996; D.M. Finucane et al., 1999).

Pro- 그리고 anti-apoptotic Bcl-2 family는 미토콘드리아의 표면에서 만나 cytochrome c의 방출을 조절하기 위해서 경쟁한다. 만약에 pro-apoptotic group이 증가하면 미토콘드리아 내에서 cytochrome c가 방출되고 세포사멸이 활성화된다(S.O. Klaus et al, 1998). 따라서 anti-apoptotic Bcl-2의 단백질 수준은 변화가 없었지만 pro-apoptotic Bax의 양이 증가함으로써 결과적으로 Bcl-2/Bax 의 단백질 비율이 감소함에 따라 화피 추출물이 HL-60 세포 내에서 세포사멸을 야기한다는 결론을 내릴 수 있었다.

Caspase는 기질 내, aspartic acid 다음을 절단하는 기질특이성에 기초하여 한 종류의 caspase가 다른 종류의 caspase를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며 이러한 기작을 통해 caspase 효소들의 상호활성화가 일어난다. 또한 이러한 효소들은 PARP, Lamin, 세포 골격 단백질과 PAK2 등 몇몇 기질을 절단함으로써 그들의 기능을 소실시키고 그 결과, 스트레스를 받은 세포 내에서 세포사멸의 다양한 구조적, 생화학적 특성을 나타내도록 한다. 특히 핵에 존재하는 효소인 PARP는 DNA 손상 회복에 관여하고 세포 내 DNA 가수분해효소의 활성을 억제한다고 알려져 왔다. PARP의 촉매부위(catalytic domain)는 세포사멸을 거치는 여러 세포에서 caspase-3를 포함한 여러 caspase에 의하여 DNA 결합 부위 (DNA binding site)로부터 절단되어 분리된다. 따라서 절단된 PARP는 많은 고등세포에서 세포사멸의 신호로 작용할 것으로 추정된다( S. Nigata, 2000; P.J. Duriez et al., 1997; X. Li et al., 2000)

이상의 결과로 미루어 화피 추출물은 *in vitro* 에서 활성산소종에 의해 산화적 스트레스를 입은 정상세포 내에서 항산화 효과를 가질 뿐만 아니라, KB, 및 HL-60 세포에 대해서는 암세포사멸을 나타낸다고 결론 내릴 수 있다.

#### 발명의 효과

본 발명에 따른, 화피 추출물 및 분획물은 세포 손상의 주요 원인이 되는 라디칼과 과산화지질을 고농도에서 억제하며, 세포 내의 항산화 효소의 활성을 증가시켜 활성산소종을 제거함으로써 세포 손상을 방지 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화피 추출물은 세포 손상을 방지하는 항산화 약물로 사용할 수 있다.

또한 본 발명에 따른 화피 추출물은, 암세포에서 세포핵의 분절 및 염색체 DNA 분절화를 유도하고, 세포 사멸을 유도하는 단백질 발현을 조절함으로써, 항암 활성을 가진다. 따라서, 항암제 약물로 사용할 수 있다.

#### [참고문헌]

- B. Halliwell, M.V. Clement and L.H. Long (2000), Hydrogen peroxide in the human body, *FEBS Lett* , 486, 10-13
- B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> ED., 1998, Oxford University
- K.K. Soudamini, and R. Kuttan (1989) Inhibition of chemical carcinogenesis by curcumin, *J. Ethnopharmacol.* , 27, 227-233
- C.B. Thompson (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* , 267, 1456-1462
- C.K. Sen (1998) Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants, *Biochem. Pharmacol.* , 55, 1747-1758
- C.V. Rao, A. Rivenson, B. Simi, and B.S. Raddy (1995) Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound, *Cancer Res.* , 55, 259-266
- D.M. Finucane, B.W. Ella, N.J. Waterhouse, T.G. Cotter, and D.R. Green (1999) Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL, *JBC* , 274(4), 2225-2

- D.M. Hockenbery, Z.N. Oltvai, and S.J. Korsmeyer (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis, *Cell*, 75, 241-251
- I. Muller, A. Jenner, G. Bruchelt, D. Niethammer, and B. Halliwell (1997) Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin-apoptosis and oxidative DNA damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 254-257
- L.Y. Chung, Y.C. Cheung, S.K. Kong, K.P. Fung, and T.T. Kwork (2001) Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells, *Life Sciences*, 68, 1207-1214
- M.L. Kuo, T.S. Huang, and J.K. Lin (1996) Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1317, 95-100
- M. Liu, J.C. Pelling, J. Ju, E. Chu, and D.E. Brash (1998) Antioxidant action via p53-mediated Apoptosis, *Cancer research*, 58, 1723-1729
- M.V. Clement, J.L. Hirpara, S. Chawdhury, and S. Pervaiz (1998) Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells, *Blood*, 92(3), 996-1002
- P.J. Duriez and G.M. Shah (1997) Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase: a sensitive parameter to study cell death, *Biochem. Cell. Biol.*, 75, 337-349
- S. Ahmad (1995), Oxidative stress and antioxidant defenses in biology, *Chapman&Hall press*, 1-61 and 210-237
- S.J. Lee, W.G. Ko, J.H. Kim, J.H. Sung, S.J. Lee, C.K. Moon, and B.H. Lee (2000) Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome *c* -mediated activation of caspase-3 protease, *Biochem. Pharm.*, 60, 677-685
- S.M. Planchon, S. Wuerzberger, B. Frydman, P. Huston, D.R. Church, G. Wilding, and D.A. Boothman (1995)  $\beta$ -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response, *Can. Res.*, 55, 3706-3711
- S. Nigata (2000) Apoptotic DNA fragmentation, *Exp. Cell. Res.*, 256, 12-18
- S.O. Klaus, F. Davide, L. Marek, W. Sebastian, and E.P. Marcus (1998) Apoptosis signaling by death receptors, *Eur.J. Biochem.*, 254, 439-459
- T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408;239-47
- T. Okura, M. Igase, Y. Kitami, T. Fukuoka, M. Maguchi, K. Kohara, and K. Hiwada (1998) Platelet-derived growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1403, 245-253
- X. Li, and Z. Darzynkiewicz (2000) Cleavage of PARP measured in *Situ* in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis, *Exp. Cell. Res.*, 255, 125-132
- Y.J. Shur (1998) Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: a mechanistic viewpoint, *Cancer J.*, 1, 6-10
- Y.S. Keum, K.K. Park, J.M. Lee, K.S. Chun, and Y.J. Shur (2000) Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng, *Cancer letters*, 150, 41-48
- ZL. Witztum, The role of oxidized low density lipoproteins in atherogenesis. *Br. Heart J* 1993;69;12-14

(57) 청구의 범위

**청구항 1.**

항산화 및 항암 활성을 나타내는, 극성 용매로 추출된 화피 추출물

**청구항 2.**

제 1 항에 있어서, 상기 극성 용매는 70% 메탄올인 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 3.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 과산화지질의 형성을 억제하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 4.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 라디칼을 소거하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 5.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 활성산소종에 의한 세포 사멸체의 형성을 저해하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 6.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(SOD), 카탈라아제(CAT), 또는 글루타치온 페록시라아제(GPX)의 활성을 촉진하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 7.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 활성산소종에 의해 유도되는 세포의 핵 분절 현상을 저해하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 8.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 활성산소종에 의한 세포의 G<sub>2</sub>/M 세포주기 정지현상을 일어나지 않게 하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 9.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 암세포에서 세포 핵 분절을 유도하는 항암 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 10.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 암 세포에서 염색체 DNA 분절을 유도하는 항암 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 11.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 암세포에서 Bax의 발현을 증가시키는 항암 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 12.**

제 1 항에 있어서, 상기 화피 추출물은 암세포에서 caspase-3의 활성을 촉진 시키는 항암 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 13.**

제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 암세포는 혈액암 세포 또는 상피암 세포인 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 14.**

항산화 활성을 나타내는 화피 분획물

**청구항 15.**

제 14 항에 있어서, 상기 화피 분획물은 에틸아세테이트 또는 부탄올에 의해 추출된 화피 분획물

**청구항 16.**

제 14 항에 있어서, 상기 화피 분획물은 핵산, 디클로로메탄, 또는 물에 의해 추출된 화피 분획물

**청구항 17.**

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 화피 분획물은 과산화지질의 형성을 억제하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 분획물

**청구항 18.**

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 화피 분획물은 활성산소종에 의한 세포의 G2/M 세포주기 정지현상을 일어나지 않게 하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 추출물

**청구항 19.**

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 에틸아세테이트, 부탄올, 또는 물에 의해 추출된 화피 분획물은, 라디칼을 소거하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 분획물

**청구항 20.**

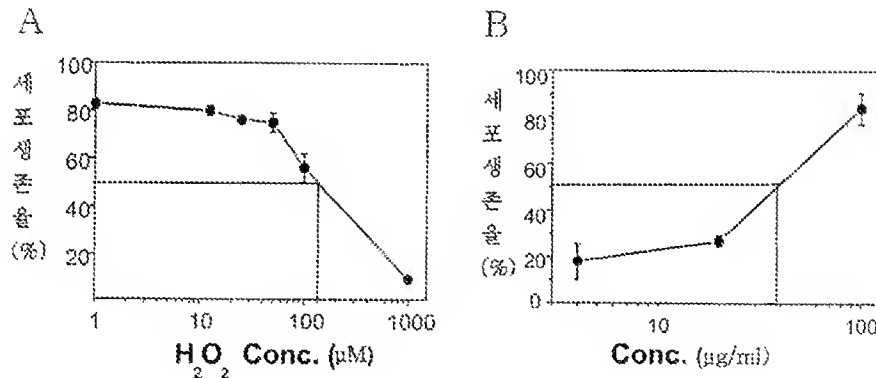
제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 화피 분획물은 활성산소종에 의한 세포 사멸체의 형성을 저해하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 분획물

**청구항 21.**

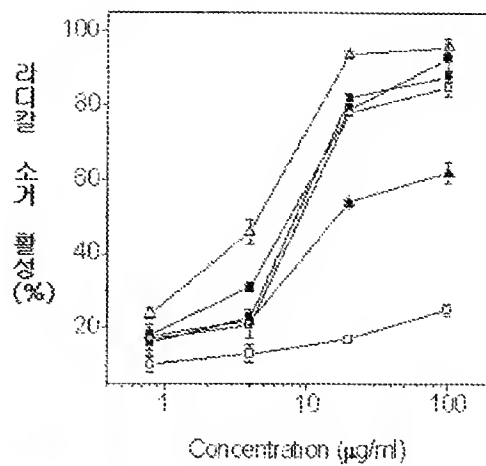
제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 화피 분획물은 슈퍼 옥사이드 디스뮤타아제(SOD), 카탈라아제(CAT), 또는 글루타치온 과산화효소(GPX)의 활성을 촉진하는 항산화 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 화피 분획물

도면

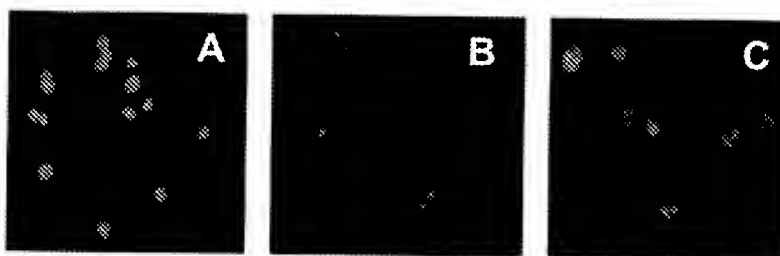
도면1



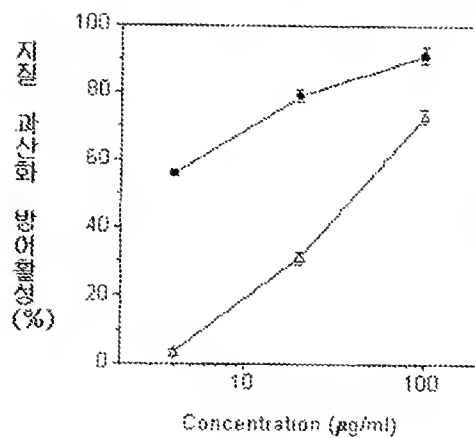
도면2



도면3

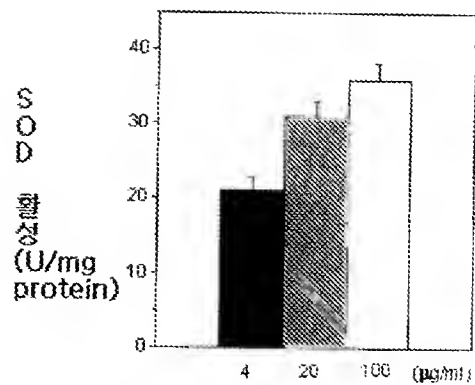


도면4

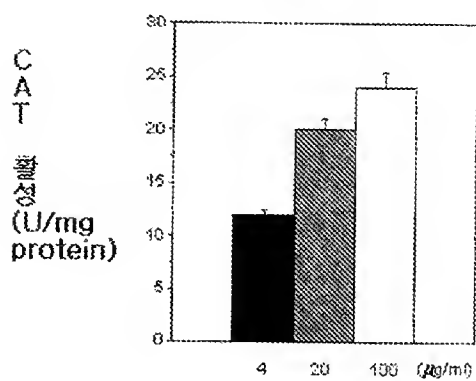


도면5

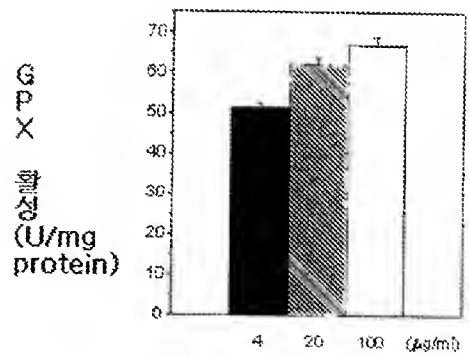
A.



B.

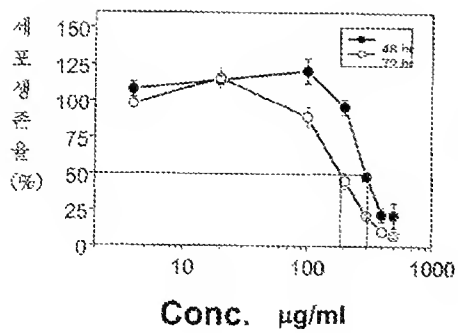


C.

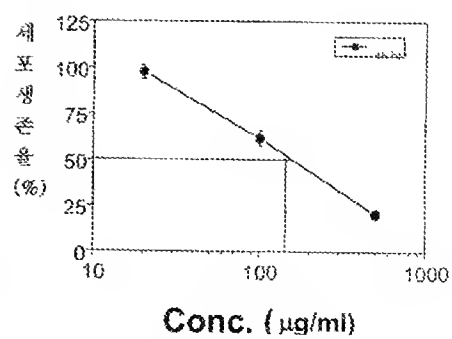


도면6

A.

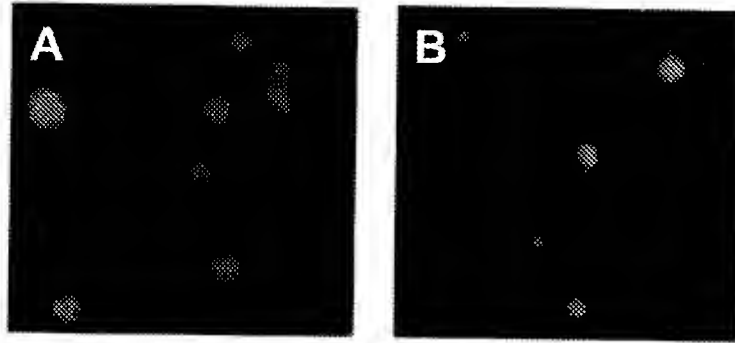


B.

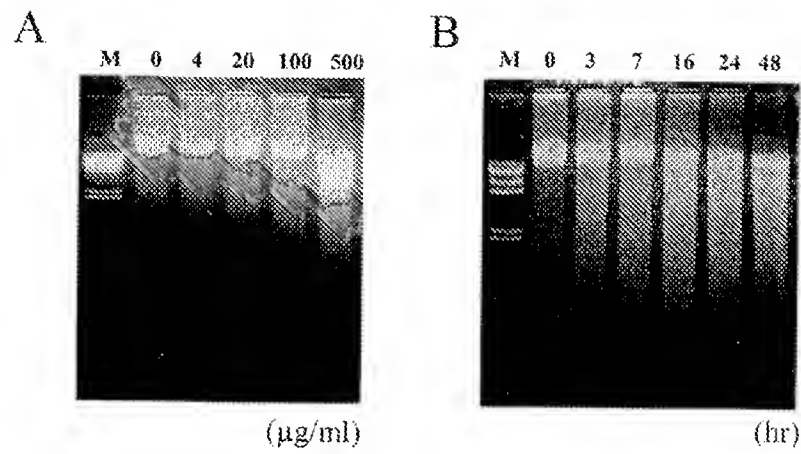




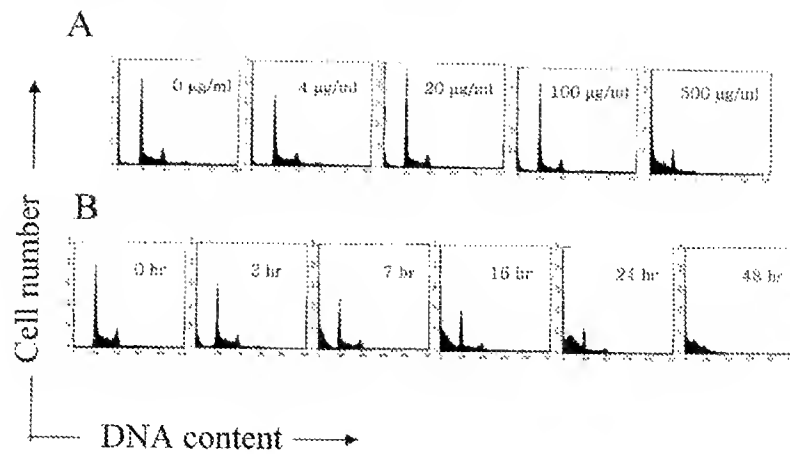
도면7



도면8



도면9



도면10

